

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Freisetzung von Acetylcholin aus dem isolierten Meerschweinchen- dünndarm durch 1,1 -Dimethyl - 4 -Phenylpiperazin

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den medizinischen Fachbereichen



vorgelegt von
Gerhard Peter Dzieniszewski
aus Koblenz

Mainz 1975

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Freisetzung von Acetylcholin aus dem isolierten Meerschweinchen- dünndarm durch 1,1 -Dimethyl - 4 -Phenylpiperazin

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Gerhard Peter Dzieniszewski
aus Koblenz

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. KLEIN

Referent: Professor Dr. E. MUSCHOLL

Korreferent: Professor Dr. K. LÖFFELHOLZ

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. Methoden	4
1. Präparation des Längsmuskelstreifens	4
2. Inkubation der Präparate	5
3. Bestimmung des Acetylcholins	7
4. Statistische Methoden	9
5. Substanzen	11
C. VERSUCHSERGEBNISSE	12
1. Dosiswirkungskurve von DMPP	12
2. Zeitverlauf der ACh-Freisetzung durch DMPP	15
3. Hemmung des DMPP-Effektes durch Hexamethonium	17
4. Calciumabhängigkeit der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung	19
5. Hemmung der durch DMPP hervorgerufenen ACh- Freisetzung in Gegenwart von Oxotremorin	22
6. Steigerung der DMPP-abhängigen ACh-Frei- setzung durch Atropin	26
D. DISKUSSION	31
E. ZUSAMMENFASSUNG	44
F. LITERATURVERZEICHNIS	47

A. EINLEITUNG

Die Stimulation autonomer Ganglienzellen durch 1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazin (DMPP) wurde 1951 von Chen et al. zum ersten Mal beschrieben. Obwohl dieser Substanz zunächst nur nicotinartige Wirkungen (Winbury, 1958; Trendelenburg, 1961) zugeschrieben wurden, gibt es für das sympathische Nervensystem einige Effekte, die nicht mit diesem Wirkungsmechanismus zu erklären sind (Lindmar, 1962; Birmingham u. Wilson, 1965).

DMPP, wie auch andere nicotinartig wirkende Substanzen, zeichnet sich am autonomen Nervensystem sowohl durch stimulierende, als auch durch hemmende Eigenschaften aus. Die stimulierende Wirkung von DMPP beschrieben Trendelenburg (1961) und Day u. Vane (1963) am isolierten Meerschweinchenileum. Danach ruft DMPP Kontraktionen des Ileums hervor. Day u. Vane (1963) vermuteten, daß DMPP über einen indirekten Effekt, d.h. Freisetzung von Acetylcholin (ACh) aus cholinergen Nerven, diese Kontraktion bewirkt. Die hemmende Wirkung von nicotinartigen Substanzen wird durch einen früh eintretenden Depolarisationsblock ("early depolarizing block") und den in einer 2. Phase auftretenden sog. "late non-depolarizing block" erklärt. Dieser wurde an Ganglien jedoch nur für das Nicotin, nicht aber für das DMPP nachgewiesen (Trendelenburg, 1967).

In der Literatur gibt es eine große Zahl von Hinweisen, die den Wirkungsmechanismus nicotinartiger Substanzen untersuchen. Es werden direkte und indirekte Wirkungen von DMPP diskutiert. Direkte Angriffspunkte von DMPP, also seine Wirkung auf Rezeptoren der Effektororgane werden an der muskulären Endplatte beschrieben. So fanden Dryden et al. (1974) am Huhnblut, trotz Hemmung der ACh-Freisetzung aus Nerven mit Hilfe des spezifischen präjunctionalen Blockers β -Bungarotoxin, durch DMPP hervorgerufene Muskelkontraktionen. Diese waren auch bei einer nervenfreien Kultur von Skelettmuskelzellen vorhanden.

Am autonomen Nervensystem kommen dagegen hauptsächlich indirekte Angriffspunkte von DMPP, also mit nachfolgender Freisetzung von ACh in Betracht. So vermuteten Day u. Vane (1963) bei Untersuchungen am isolierten Meerschweinchendünndarm eine indirekte Wirkung von DMPP. Paton u. Zar (1968) weisen mit einem denervierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms nach, daß die DMPP-Wirkung an das Vorhandensein von Nerven gebunden ist. Vizi (1973) konnte am isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms zeigen, daß DMPP eine Freisetzung von ACh bewirkt.

Für die indirekte DMPP-Wirkung am vegetativen Nervensystem werden in der Literatur zwei unterschiedliche

Wirkungsmechanismen diskutiert:

1. Eine Aufnahme nicotinartiger Substanzen in die terminalen Nervenfasern mit einer anschließenden Verdrängung des gespeicherten ACh (Chiou, 1973; Brown et al., 1971).
2. Eine durch Besetzung von Nicotinrezeptoren vermittelte Depolarisation der Nervenfaser, die zu einer Freisetzung von ACh führt (Iorio u. McIsaac, 1966; Trendelenburg, 1967; Vizi, 1973).

In der vorliegenden Arbeit wurden an Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms die Bedingungen der durch DMPP hervorgerufenen ACh-Freisetzung aus den cholinergen Nerven des Plexus myentericus (Auerbach) näher untersucht. Es wurde der Einfluß verschiedener DMPP-Konzentrationen auf die ACh-Freisetzung und der Zeitverlauf der DMPP-abhängigen ACh-Freisetzung geprüft. Mit Hilfe einiger Substanzen (Calcium, Hexamethonium, Oxotremorin und Atropin), die in der Lage sind die DMPP-bedingte ACh-Freisetzung zu modifizieren, wurden anhand weiterer Versuchsreihen Mechanismen der ACh-Freisetzung untersucht.

B. METHODEN

1. Präparation des Längsmuskelstreifens

Es wurden Meerschweinchen von 300 - 500 g Körpergewicht durch einen Nackenschlag getötet und aus den Carotiden entblutet. Nach Eröffnung des Peritonealsackes wurde der Dünndarm etwa 10 cm vor seiner Einmündung in den Blinddarm bis zur Flexura duodenojejunalis herauspräpariert. Dabei verblieb ein etwa 2 mm breites Stück des Mesenterialansatzes an dem Darm, der nun sofort in eine Petrischale mit Tyrodelösung folgender Zusammensetzung gelegt wurde: NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; CaCl_2 0,2 g; MgCl_2 0,1 g; NaHCO_3 1,0 g; NaH_2PO_4 0,05 g; Glucose 1,0 g; Aqu. dest. ad 1000 ml.

Nach Teilung des Darmes in 3 - 5 Teilstücke von 15 - 20 cm Länge wurden diese auf einen Glasstab von 5 mm Durchmesser, der in einem Winkel von 45° abgebogen war, aufgezogen und dabei von ihrem Inhalt entleert. Mit einem Skalpell wurde die äußere Längsmuskelschicht auf beiden Seiten dicht neben dem verbliebenen Mesenterialansatz bis zur darunterliegenden Ringmuskulatur durchtrennt. Die gesamte Längsmuskulatur wurde mit einer anatomischen Pinzette millimeterweise von ihrer Unter-

lage gelöst und vorsichtig abgezogen. Man erhielt so eine etwa 1,5 cm breite Längsmuskelplatte, die außen von viszeralem Peritoneum bedeckt war und an deren Innenseite der Plexus myentericus (Auerbach) haftete.

Die Gewichte der von einem Meerschweinchen erhaltenen Längsmuskulatur des Dünndarms variierten zum Teil erheblich (100 - 400 mg), was von den einzelnen Versuchstieren und der jeweiligen Präparationsqualität abhing. Mit einem Faden wurden die Muskelstreifen zu 100 - 300 mg schweren Präparaten zusammengebunden. Ähnliche Methoden wurden von Ambache (1954) für den Kaninchendarm, von Rang (1964) und Paton u. Zar (1968) für den Meerschweinchendünndarm beschrieben.

2. Inkubation der Präparate

In ein Wasserbad, dessen Temperatur ein Thermostat bei 37°C hielt, wurden 10 ml-Zentrifugengläser mit 4 ml Tyrode und dem Cholinesterasehemmer Diisopropylfluorophosphat (DFP; 10^{-5} M) gestellt. Die DFP-Tyrode wurde mit Carbogen, einer Mischung aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, begast. In diese vorgewärmte Lösung wurden die an einen Plexiglasstab befestigten 100 - 300 mg schweren Präparate gegeben und 90 Minuten äquilibriert, indem die Badflüssigkeit nach 30, 60 und 80 Minuten jeweils durch eine frische Lösung ersetzt wurde.

Nach der Vorinkubationsperiode wurde zunächst in einem 3-Minutenintervall die Ruhefreisetzung und anschließend die ACh-Freisetzung in Gegenwart von DMPP an demselben Präparat zu zwei oder drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die durch DMPP freigesetzte Menge an ACh wurde ermittelt, indem der Betrag der Ruhefreisetzung von der gesamten in Anwesenheit von DMPP freigesetzten Acetylcholinmenge subtrahiert wurde.

Aus methodischen Gründen konnte nicht die Ruhefreisetzung aus jedem Muskelstreifen bestimmt werden. Da die Nachweisgrenze der hier benutzten Methode bei etwa 0,1 nmol ACh pro Probe liegt, war die Ruhefreisetzung über einen Zeitraum von 3 Minuten nur bei solchen Präparaten, die mehr als 200 mg wogen, sicher meßbar. Wenn die Ruhefreisetzung unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurde der Mittelwert aus allen Ruhefreisetzungen (0.35 ± 0.05 nmol ACh/g x min; n = 33) von der Gesamtfreisetzung subtrahiert. Die Inkubationsdauer in DMPP-Tyrode betrug jeweils 3 Minuten. Nach dem 1. DMPP-Effekt (0 - 3 min) wurde die Inkubationslösung des Organpräparates über einen Zeitraum von 27 Minuten nach einem konstant gehaltenen Zeitschema in der 4., 5., 6., 10. und 20. Minute durch je 4 ml DFP-Tyrode ersetzt. Damit sollte das noch verbliebene DMPP ausgespült werden. Danach schloß sich die 2. Sammlerperiode mit DMPP (30 - 33 min) an. Der Einfluß von Pharmaka

(Hexamethonium, Oxotremorin u. Atropin) auf die DMPP-bedingte ACh-Freisetzung wurde geprüft, indem die zu untersuchende Substanz vor und während des zweiten DMPP-Effektes (30 - 33 min) in der Badflüssigkeit war. Da die Absolutwerte der ACh-Freisetzung in einem Inkubationsintervall von Präparat zu Präparat zum Teil erheblich schwankten, wurden die erhaltenen Änderungen der DMPP-abhängigen ACh-Freisetzungen in Prozent der 1. ACh-Freisetzung (0 - 3 min) angegeben.

In einigen Versuchen wurde die Wirkung einer dritten DMPP-Inkubation auf die ACh-Freisetzung untersucht. Der 3. DMPP-Effekt (60 - 63 min) sollte zeigen, daß die Muskelstreifen durch das Pharmakon (Oxotremorin), das die ACh-Freisetzung während des 2. Effektes modifizierte, nicht irreversibel geschädigt worden waren. Die Präparate wurden dazu zwischen dem 2. und 3. Inkubationsintervall über eine Zeit von 27 Minuten mit DFP-Tyrode in oben beschriebener Weise gespült.

3. Bestimmung des Acetylcholins

Die nach jeder Sammelperiode gewonnene Inkubationsflüssigkeit wurde sofort in ein eisgekühltes 20-ml-Zentrifugenglas überführt. Es enthielt je 1 nmol Propionylcholin sowie Butyrylcholin als innere Standards und 0,2 ml einer 1 mM Tetraäthylammoniumchloridpentahy-

dratlösung (TEA). Die Cholinester in den Inkubationsproben wurden mit 4 ml einer eiskalten 2%-igen Reinecke-lösung zusammen mit dem Kopräzipitans TEA gefällt und eine Stunde in Eis gestellt. Nach der 3-Minuten-Zentrifugation bei 0° C wurde der erhaltene Niederschlag mit 1 ml eiskaltem Propan-1-ol gewaschen und über Nacht in einem Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Dem Niederschlag wurde 0,3 ml einer Suspension des Anionenaustauschers Biorex 9 in wasserfreiem Methanol zugefügt. Die Cholinester in der methanolischen Phase wurden nach dem Anionenaustausch 30 Minuten bei 80° C zu den jeweiligen tertiären Aminen demethyliert. Das Demethylierungsgemisch bestand aus 0,1 ml einer Lösung von 50 mM Thiophenol-Na und 25 mM Thiophenol in wasserfreiem Methyläthylketon. Zu jeder Probe wurde anschließend 20 µl einer 0,5 M Zitronensäurelösung und 0,1 ml Pentan gegeben. Nach dem Ausschütteln wurden die Gemische bei 0° C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch den Zusatz von 0,1 ml eiskaltem Diäthyläther und 20 µl Ammoniakpuffer wurden die tertiären Amine extrahiert und die Lösung durch Mikrodestillation bei 40° C auf ein Volumen von 3 - 5 µl konzentriert. Anschließend erfolgte die gaschromatographische Bestimmung der Cholinester nach einer von Kilbinger (1973) beschriebenen Methode.

Keine der aufgeführten Substanzen interferierte mit der ACh-Bestimmung. ACh war der einzige Cholinester, den das Längsmuskelpräparat enthielt. Der ACh-Gehalt in den Inkubaten wurde durch Vergleich der Peakfläche von ACh mit den Peakflächen der Standards Propionylcholin und Butyrylcholin errechnet. Die aufgeführten ACh-Konzentrationen ergaben sich aus dem arithmetischen Mittelwert der Doppelbestimmungen.

Es wurden Eichfaktoren anhand von 24 Eichproben mit ACh-Konzentrationen zwischen 0,5 - 6 nmol ACh ermittelt. Der Variationskoeffizient, als Maß der Genauigkeit der gaschromatographischen ACh-Bestimmungsmethode, lag bei 8 %.

4. Statistische Methoden

Es wurden Mittelwerte unverbundener Beobachtungsreihen auf signifikante Unterschiede geprüft; diesen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 5\%$ zugrunde gelegt. Alle Streuungsangaben stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$); n ist die Anzahl der Einzelversuche.

In der Auswertung kamen parametrische und parameterfreie Verfahren zur Anwendung (Koller, 1969). In Versuchsreihen mit $n > 10$ wurde durch Auftragung von Einzelwerten in ein halblogarithmisches Wahrscheinlich-

keitsnetz auf Normalverteilung geprüft. Bei Versuchsreihen mit $n < 10$ wurden den Einzelwerten tabellierte Summenhäufigkeiten zugeteilt (Stange, 1970).

Bei Normalverteilung diente beim Vergleich von nur zwei Mittelwerten unverbundener Beobachtungsreihen der t-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede. Im Gegensatz dazu wurden beim Mittelwertsvergleich von 2 unverbundenen Versuchsreihen mit nur geringem Stichprobenumfang ($n < 5$) Unterschiede mit einem nicht parametrischen Verfahren (Rangtest nach Wilcoxon bzw. Mann-Whitney) ermittelt.

Mehrere Mittelwerte wurden mit einer einfachen Varianzanalyse für gleiche bzw. ungleiche Stichprobenumfänge simultan miteinander verglichen. Die Testgröße F diente zur Ermittlung, ob sich Varianzen zwischen den Mittelwerten der Versuchsgruppen k signifikant von den Varianzen innerhalb der Versuchsreihen n unterschieden.

Mit Hilfe des Tests nach Scheffé wurde dann durch Bildung aller möglichen Differenzen zwischen Mittelwerten festgestellt, welche dieser Mittelwerte sichere Unterschiede voneinander aufwiesen (Koller, 1969). Es wurden dabei keine komplizierten Kontraste sondern nur einfache Differenzpaare untersucht. Die im Scheffé-Test erhaltene Testgröße wurde mit dem Produkt aus F-Wert der

Varianzanalyse und Freiheitsgrad zwischen den Versuchsgruppen $[(k-1) F_{\alpha}]$ verglichen.

5. Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Acetylcholinjodid; Butyrylcholinjodid; Propionylcholinjodid (alle Fluka, Buchs); 1,1-Dimethyl-4-phenylpiperaziniumjodid (Parke, Davis u. Co); Hexamethoniumbromid (Fluka, Buchs); Diisopropylfluorophosphat (DFP; Roth, Karlsruhe); Atropinsulfat (C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim); Oxotremorin (EGA Chemie, Steinheim).

C. ERGEBNISSE

1. Dosiswirkungskurve von DMPP

Die DMPP-bedingte ACh-Freisetzung aus Längsmuskelstreifen in die Inkubationsflüssigkeit wurde anhand einer Dosiswirkungskurve untersucht. Es wurden DFP-haltige Tyrodelösungen mit DMPP-Konzentrationen zwischen 10^{-6} - 10^{-4} M verwendet. Dabei wurde an einem Muskelstreifen jeweils nur die Wirkung von einer DMPP-Konzentration untersucht.

Nach 90 Minuten Vorinkubation in 10^{-5} M DFP-Tyrode wurden die Längsmuskelpräparate über einen Zeitraum von 3 Minuten in 4 ml DMPP-haltige DFP-Tyrode inkubiert. In Abb. 1 sind die freigesetzten ACh-Mengen dieses Inkubationsintervalls dargestellt. Der ACh-Gehalt jedes Inkubates wurde als das in 1 Minute freigesetzte ACh in nmol pro g Gewebe ausgedrückt. Die große Anzahl der Einzelversuche ($n = 85$) bei der 10^{-5} M DMPP-Konzentration entstand dadurch, daß nur bei dieser DMPP-Konzentration die Änderung der ACh-Freisetzung durch Pharmaka in der 2. Inkubationsperiode (30 - 33 min) untersucht wurde.

Die Dosiswirkungskurve war glockenförmig, d.h. sie hatte einen ansteigenden und einen absteigenden Ast. Mit dem t-Test für unverbundene Stichprobenumfänge wurde untersucht, ob Unterschiede in den DMPP-bedingten ACh-Freisetzungen bei verschiedenen DMPP-Konzentrationen bestanden. Die ACh-Freisetzung stieg zwischen den DMPP-Konzentrationen 3×10^{-6} M (0.48 ± 0.02 nmol ACh/g x min) und 3×10^{-5} M (1.82 ± 0.31 nmol ACh/g x min) signifikant an ($p < 0.05$). Für den Abfall der Dosiswirkungskurve zwischen den DMPP-Konzentrationen 3×10^{-5} M und 10^{-4} M (0.93 ± 0.25 nmol ACh/g x min) ergab sich ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$.

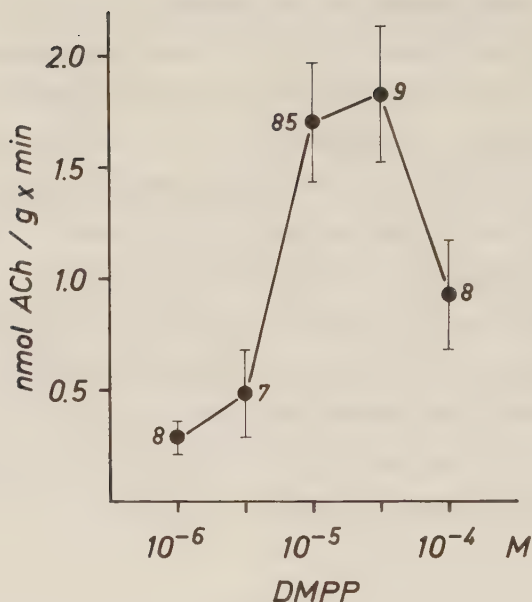


Abb. 1

Dosiswirkungskurve von DMPP

Die Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms wurden 3 Minuten lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von DMPP in DFP-haltiger Tyrodelösung inkubiert.

Ordinate: freigesetztes ACh in nmol pro g Gewebe und Minute. Die durch DMPP freigesetzte Menge an ACh wurde ermittelt, indem der Betrag der Ruhefreisetzung von der gesamten in Anwesenheit von DMPP freigesetzten Acetylcholinmenge subtrahiert wurde.

Abszisse: DMPP-Konzentrationen

Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$); n ist die Anzahl der Einzelversuche.

2. Zeitverlauf der ACh-Freisetzung durch DMPP

Nicotinartige Substanzen bewirken am perfundierten Kaninchenherzen eine "explosionsartige" Noradrenalinfreisetzung (Löffelholz, 1970). Am isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms erreicht die ACh-Freisetzung durch DMPP nach 15 Sekunden ein Maximum (Vizi, 1973).

Der Zeitverlauf der ACh-Abgabe in die Inkubationsflüssigkeit wurde bei einer 10^{-5} M DMPP-Konzentration untersucht (Abb.2). Dazu wurden die Muskelstreifen über einen Zeitraum von 5 Minuten für jeweils 1 Minute in die DMPP-haltige Tyrodelösung getaucht. Um die schon erwähnte gaschromatographische Nachweisgrenze von 0.1 nmol ACh pro Probe nicht zu unterschreiten, wurde nur die Gesamtfreisetzung (Ruhefreisetzung + evozierte Freisetzung durch DMPP) berücksichtigt.

Der Mittelwert, der in Minutenabständen gesammelten ACh-Freisetzung, erreichte in der 1. Sammelperiode den höchsten Wert: 4.76 ± 1.34 nmol ACh/g x min (n = 6). In der 2. Minute fiel die gemessene ACh-Konzentration auf 2.12 ± 0.27 nmol ACh/g x min (n = 6) ab. Zwischen der 3. und 5. Minute lagen die ACh-Mengen bei 2 nmol/g x min. Die Kurve beschreibt 2 Phasen der Freisetzung: Eine erste schnelle Phase, die zwischen der 1. und 2. Minute

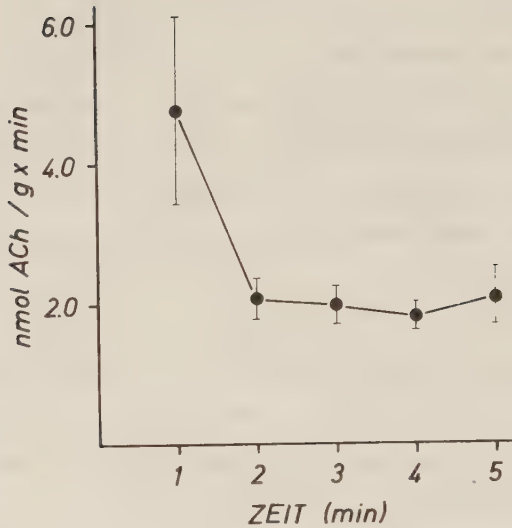


Abb. 2:

Zeitverlauf der ACh-Freisetzung in Gegenwart von DMPP 10^{-5} M

Die Muskelstreifen wurden 5 Minuten mit DMPP inkubiert. Der ACh-Gehalt der Inkubate wurde kontinuierlich in 1-Minutenabständen gemessen.

Ordinate: Freigesetzte ACh-Menge in nmol pro g Gewebe und Minute.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten.

Die angegebenen ACh-Mengen stellen die Gesamtfreisetzungen (Ruhefreisetzung und Freisetzung durch DMPP) dar. Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 6 Einzelversuchen.

mit einer Halbwertszeit von etwa $t_{1/2} = 30$ Sekunden abnimmt und eine anschließende kontinuierliche Freisetzung von ACh, die in der Größenordnung von $2 \text{ nmol/g} \times \text{min}$ liegt.

3. Hemmung des DMPP-Effektes durch Hexamethonium

Hexamethonium ist in der Lage die durch DMPP hervorgerufenen Kontraktionen des Meerschweinchenileums zu hemmen (Chiou, 1973).

In 4 Experimenten wurde die DMPP-abhängige ACh-Freisetzung in Gegenwart von Hexamethonium ($2.8 \times 10^{-4} \text{ M}$) untersucht (Abb.3). Die Muskelstreifen wurden 90 Minuten in 10^{-5} M DFP-Tyrode äquilibriert. Danach wurde in einer Sammelperiode von 3 Minuten zu jedem Einzelversuch die zugehörige Ruhefreisetzung bestimmt. Der Ruhefreisetzungsmittelwert betrug $0.71 \pm 0.09 \text{ nmol ACh/g} \times \text{min}$ ($n = 4$).

In einem weiteren 3-Minutenintervall wurde die Freisetzung durch DMPP (10^{-5} M) ermittelt; es resultiert eine Gesamtfreisetzung von $2.01 \pm 0.46 \text{ nmol ACh/g} \times \text{min}$ ($n = 4$). Bis zur 10. Minute wurde das Inkubationsmedium in Minutenabständen durch je 4 ml frische DFP-Tyrode ersetzt, um das DMPP aus dem Gewebe auszuwaschen. Es folgte bis zur 30. Minute die Inkubation mit Hexamethonium ($2.8 \times 10^{-4} \text{ M}$) in zwei 10-Minutenintervallen.

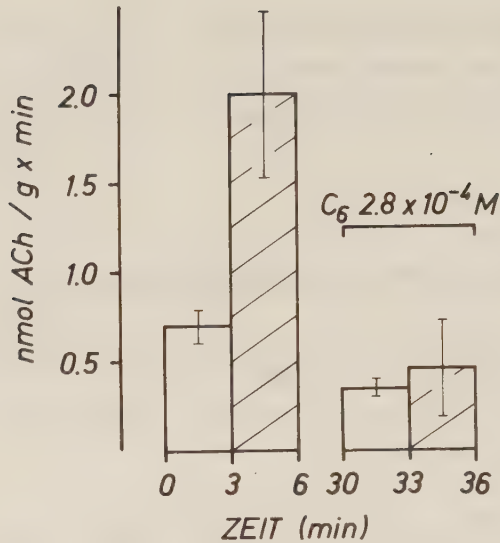


Abb. 3:

Hemmung der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung durch Hexamethonium

Die Bestimmung der ACh-Freisetzung erfolgte in vier 3-Minutenintervallen.

Ordinate: ACh-Konzentration in nmol pro g Gewebe und Minute.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten. Die Unterbrechung der Abszisse stellt die Spülperiode mit DFP-Tyrode (6 - 10 min) und die anschließende Inkubation mit Hexamethonium (10 - 30 min) dar.

Offene Säulen: ACh-Ruhefreisetzung.

Schraffierte Säulen: DMPP-bedingte Freisetzung von ACh. $C_6 =$ Hexamethonium ($2.8 \times 10^{-4} M$). Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus je 4 Einzelversuchen.

Danach wurde die Wirkung von Hexamethonium auf die Ruhefreisetzung untersucht (30 - 33 min). Der gemessene ACh-Wert betrug 0.35 ± 0.05 nmol ACh/g $\times$ min ($n = 4$); diese Hemmung der Ruhefreisetzung auf 49 % entsprach größenordnungsmäßig den Literaturwerten (Kilbinger u. Wagner, 1975; Paton, Vizi u. Zar, 1971). Hexamethonium hemmte die DMPP-abhängige ACh-Freisetzung (33 - 36 min), nach Abzug der durch Hexamethonium beeinflussten Ruhefreisetzung, auf 0.11 ± 0.05 nmol ACh/g $\times$ min ($n = 4$). Der Vergleich mit dem DMPP-Effekt in Abwesenheit von Hexamethonium (3 - 6 min) zeigte somit eine durchschnittliche Hemmung auf 10 %. Beide Werte waren im Wilcoxon-Rangtest signifikant unterschieden ($p < 0.05$).

4. Calciumabhängigkeit der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung

Bei elektrischer Feldstimulation fand Vizi (1972) am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchenileums eine Calciumabhängigkeit der ACh-Freisetzung.

Der CaCl_2 -Gehalt der Tyrodelösung wurde auf 0.36 mVal gesenkt, was 1/10 derjenigen Calciumionenkonzentration entsprach, die bei allen anderen Versuchen in der Tyrodelösung enthalten war. Das zeitliche Schema des Inkubationsversuches war bis auf die 10 Minuten längere Inkubation mit calciumarmer Tyrode (10 - 40 min) mit dem zeitlichen Schema der Hexamethoniumversuche identisch.

Der Mittelwert der zu jedem Einzelversuch bestimmten Ruhefreisetzung (0 - 3 min) betrug 0.40 ± 0.03 nmol ACh/g x min ($n = 4$); die Gesamtfreisetzung von ACh wurde durch eine 10^{-5} M DMPP-Lösung (3 - 6 min) auf 1.61 ± 0.54 nmol ACh/g x min gesteigert (Abb. 4).

Nach der oben erwähnten Inkubationsperiode von 30 Minuten wurde die Wirkung der calciumarmen Tyrode (C.36 mVal) auf die Ruhefreisetzung untersucht (40 - 43 min). Der Wert lag mit 0.41 ± 0.11 nmol ACh/g x min ($n = 4$) in der Größenordnung der Ruhefreisetzung. Die Freisetzung in Gegenwart von DMPP 10^{-5} M in der nächsten 3-Minutenperiode (43 - 46 min) betrug 0.46 ± 0.15 nmol ACh/g x min; dies bedeutet beim Vergleich beider DMPP-Effekte (nach Abzug der entsprechenden Ruhefreisetzung in den Inkubationsintervallen 0 - 3 bzw. 40 - 43 min) eine signifikante Hemmung auf 3%. Mit Hilfe des Wilcoxon-Rangtests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ ermittelt.

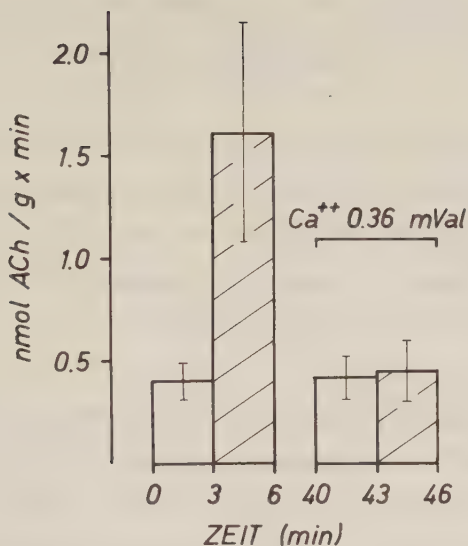


Abb. 4:

Beeinflussung der DMPP-abhängigen ACh-Freisetzung durch calciumarme Tyrode (Ca^{++} 0.36 mVal)

Die ACh-Freisetzung wurde in vier 3-Minutenperioden untersucht.

Ordinate: ACh-Konzentration in nmol pro g Gewebe und Minute.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten. Die Unterbrechung der Abszisse stellt die Spülperiode mit DFP-Tyrode (6 - 10 min) und die Inkubation mit calciumarmer Tyrode (10 - 40 min) dar.

Offene Säulen: ACh-Ruhefreisetzung.

Schraffierte Säulen: DMPP-abhängige Freisetzung von ACh.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus je 4 Einzelversuchen.

5. Hemmung der durch DMPP hervorgerufenen ACh-Freisetzung in Gegenwart von Oxotremorin (OT)

Am Meerschweinchendünndarm fanden Cox und Hecker (1971) bei Untersuchungen mit dem stark muskarinartig wirkenden Oxotremorin eine Hemmung der ACh-Freisetzung. Diese Ergebnisse wurden von Szerb und Somogyi (1973) an Hirnschnitten der Ratte bestätigt.

Es wurde geprüft, ob Oxotremorin einen Einfluß auf die durch DMPP (10^{-5} M) hervorgerufene Steigerung der ACh-Freisetzung hat. Die verwendeten Oxotremorinkonzentrationen betrugen 10^{-4} und 10^{-5} M. Nach Vorinkubation von 90 Minuten in DFP-Tyrode wurden 3 DMPP-Effekte (D_1 , D_2 u. D_3) jeweils im Abstand von 30 Minuten (0 - 3, 30 - 33 u. 60 - 63 min) untersucht. Die freigesetzten ACh-Mengen D_2 und D_3 (30 - 33 bzw. 60 - 63 min) wurden in Prozent der 1. Freisetzung D_1 (0 - 3 min) ausgedrückt. Oxotremorin war während der 2. Inkubationsperiode (30 - 33 min) in der Badflüssigkeit. Von der 25. - 30. Minute wurden die Muskelstreifen vor dem 2. DMPP-Effekt zunächst mit Oxotremorin vorinkubiert.

Die Kontrollfreisetzung von DMPP 10^{-5} M (ohne Oxotremorin), also die ACh-Freisetzung D_2 betrug $99.8 \pm 7\%$ ($n = 13$) von D_1 (Abb. 5). Die Zugabe von Oxotremorin 10^{-5} M hemmte die ACh-Freisetzung D_2 um 29 % auf $71 \pm 6\%$

(n = 13). Nach Steigerung der Oxotremorindosis auf 10^{-4}M betrug die prozentuale Freisetzungshemmung $52 \pm 7\%$ (n = 13) von D_1 .

In der varianzanalytischen Betrachtung dieser drei prozentualen Freisetzungsverhältnisse ergab sich ein hoch signifikanter F-Wert ($p < 0.01$). Im Scheffé-Test zeigte sich eine signifikante Hemmung der DMPP-abhängigen ACh-Freisetzung durch OT 10^{-5}M ($p < 0.05$) und ein noch deutlicherer Unterschied der ACh-Freisetzungshemmung durch OT 10^{-4}M ($p < 0.005$) gegenüber den Kontrollversuchen. Beide Oxotremorinkonzentrationen unterschieden sich jedoch hinsichtlich ihrer ACh-Freisetzungshemmung nicht signifikant voneinander.

Die Präparate wurden nach dem 2. DMPP-Effekt D_2 über eine Zeit von 27 Minuten mit DFP-Tyrode gespült und während der 3. ACh-Freisetzungsperiode (60 - 63 min) in DMPP-Tyrode (10^{-5}M) inkubiert. Es wurde damit geprüft, ob der Hemmungseffekt des im 2. Inkubationsintervall (30 - 33 min) zugesetzten Oxotremorins reversibel war. Alle aufgeführten Werte stellen das prozentuale Freisetzungsverhältnis von D_3 (60 - 63 min) zu D_1 (0 - 3 min) dar. Die Kontrollfreisetzung (ACh-freisetzen aus den Längsmuskelpräparaten, die nur mit DMPP behandelt wurden) betrug $104 \pm 14\%$ (n = 5). Für die Längsmuskelstreifen, die in der 2. Sammelperiode

mit Oxotremorin 10^{-5} bzw. 10^{-4} M inkubiert wurden, ergaben sich prozentuale ACh-Freisetzungsverhältnisse von $77 \pm 8 \%$ ($n = 3$) bzw. $79 \pm 6 \%$ ($n = 6$).

In der Varianzanalyse waren diese 3 Werte gerade noch verschieden ($p = 0.05$), der Scheffé-Test zeigte jedoch keine Unterschiede. Im t-Test ergaben jeweils die Einzelvergleiche der 2. Inkubationsintervalle (30 - 33 min) mit den 3. Sammelperioden (60 - 63 min) keine signifikanten Unterschiede.

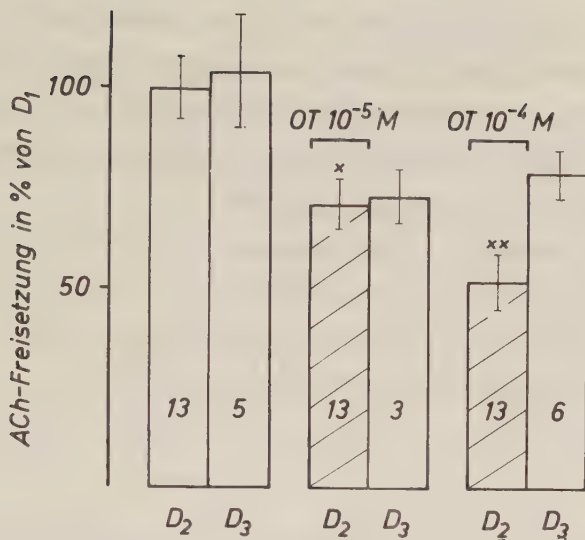


Abb. 5:

Hemmung der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung in Gegenwart von Oxotremorin

Es wurden die ACh-Freisetzungen D_2 und D_3 in der 2. bzw. 3. Sammelperiode (30 - 33 bzw. 60 - 63 min) in Prozent der 1. ACh-Freisetzung D_1 (0 - 3 min) angegeben (Ordinate).

Linkes Säulenpaar: Kontrollfreisetzungen

Mittleres und rechtes Säulenpaar: die schraffierten Säulen zeigen die ACh-Freisetzung bei Anwesenheit von Oxotremorin (OT) (30 - 33 min), die offenen Säulen die ACh-Freisetzung ohne Oxotremorin (60 - 63 min).

Dargestellt sind die prozentualen Freisetzungsverhältnisse (D_2/D_1 bzw. D_3/D_1) mit ihren Standardfehlern ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Die

Anzahl der Einzelversuche ist in den betreffenden Säulen verzeichnet. Kreuze über den Säulen von D_2 stellen signifikante Unterschiede zwischen der ACh-Kontrollfreisetzung und der ACh-Freisetzung in Gegenwart von Oxotremorin dar: x: $p < 0.05$; xx: $p < 0.005$.

Die Absolutwerte der ACh-Freisetzungen D_1 (0 - 3 min) betrugen 1.06 ± 0.09 nmol ACh/g x min ($n = 13$; Ktr.), 1.64 ± 0.23 nmol ACh/g x min ($n = 10$; OT 10^{-5}) und 1.3 ± 0.09 nmol ACh/g x min ($n = 10$; OT 10^{-4}).

6. Steigerung der DMPP-abhängigen ACh-Freisetzung durch Atropin

Dudar u. Szerb (1969) beschrieben am Hirn der narkotisierten Katze eine durch Atropin hervorgerufene ACh-Freisetzungssteigerung bei elektrischer Reizung.

In den eigenen Versuchen wurde der Einfluß von Atropin auf die durch DMPP stimulierte ACh-Freisetzung untersucht (Abb. 6). Die ACh-Konzentrationsangaben stellen das prozentuale Freisetzungsverhältnis der 2. Sammelperiode (30 - 33 min) in Gegenwart von Atropin zur 1. Kontrollfreisetzung D_1 (0 - 3 min) ohne diese Substanz dar (vgl. Oxotremorinversuche).

Das prozentuale Kontrollfreisetzungsverhältnis (ohne Atropin)

betrug $99.8 \pm 7 \%$ ($n = 13$). Nach Zugabe einer $10^{-7}M$ Atropinlösung stieg die ACh-Freisetzung auf $124 \pm 11 \%$ ($n = 9$) an. Dieser Unterschied war im Scheffé-Test nicht signifikant ($p > 0.05$). Mit einer 10-fach höheren Atropindosis ($10^{-6}M$) wurde die ACh-Freisetzung signifikant auf $228 \pm 20 \%$ ($n = 6$) vergrößert ($p < 0.05$). Eine weitere Steigerung der Atropinkonzentration auf $3 \cdot 10^{-6}M$ ließ die ACh-Freisetzung um 8 % auf $220 \pm 48 \%$ ($n = 5$) abfallen. Für diese 120 %-ige Steigerung gegenüber der Kontrolle wurde das Signifikanzniveau von $p = 0.05$ gerade nicht erreicht.

Es wurde ferner untersucht, ob die Vorinkubationsdauer einen Einfluß auf den steigernden Atropineffekt ausübt. Für die Atropinkonzentrationen 10^{-7} und $10^{-6}M$ wurde die sonst angewandte Vorinkubationsperiode (25 - 30 min) um 5 auf 10 Minuten verlängert (20 - 30 min). Gegenüber der Kontrolle wurde die DMPP-abhängige ACh-Freisetzung durch eine $10^{-7}M$ Atropinlösung auf $123 \pm 11\%$ ($n = 4$) und durch eine $10^{-6}M$ Atropindosis auf $208 \pm 31 \%$ ($n = 3$) erhöht. Beide ACh-Freisetzungssteigerungen zeigten im t-Test im Vergleich mit den entsprechenden Atropinkonzentrationen mit kürzerem Vorinkubationsintervall keine signifikanten Unterschiede.

Szerb u. Somogyi (1973) fanden an Hirnschnitten der Ratte, daß der hemmende muskarinartige Effekt von

Oxotremorin auf die Ruhefreisetzung durch das anti-muskarinartig wirkende Atropin zu antagonisieren ist. Es wurde daher in einer weiteren Versuchsreihe geprüft, ob der steigernde Atropineffekt (3×10^{-6} M) auf die DMPP-abhängige ACh-Freisetzung durch gleichzeitige Gabe von Oxotremorin (10^{-4} M) zu hemmen ist (Abb.6). Der erhaltene Wert lag mit 92 ± 10 % ($n = 7$) im Bereich der Kontrollfreisetzung (98 ± 7 %).

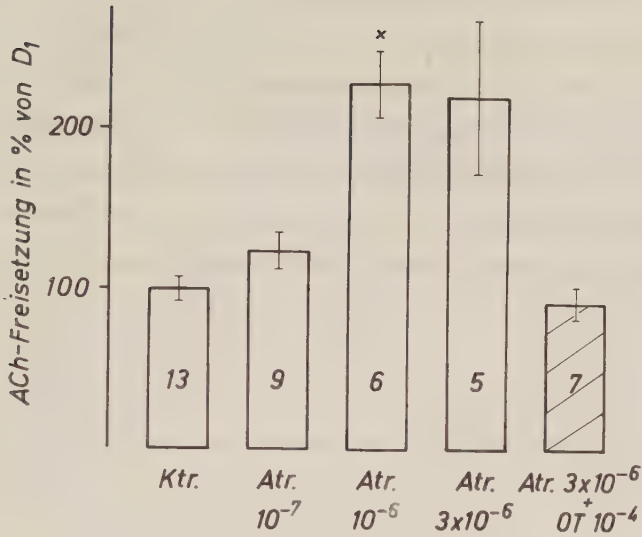


Abb. 6:

Steigerung der DMPP-abhängigen ACh-Freisetzung durch Atropin

Ordinate: ACh-Freisetzung der 2. Sammelperiode (30 - 33 min) in Prozent der Freisetzung des 1. Inkubationsintervalles (0 - 3 min).

Atr. = Atropin von 25 - 33 Minuten im Inkubationsmedium;

Atr. + OT = Atropin und Oxotremorin von 25 - 33 Minuten im Inkubationsmedium.

Angegeben sind die prozentualen Freisetzungsverhältnisse D_2/D_1 mit ihren Standardfehlern ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). In jeder Säule ist die Anzahl der Einzelversuche verzeichnet; ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zwischen Kontrollfreisetzung

und ACh-Freisetzung in Gegenwart von Atropin wurde mit einem Kreuz (x) versehen.

Die Absolutwerte der ACh-Freisetzungen D_1 (0 - 3 min) betrugen: 1.92 ± 0.27 nmol ACh/g x min (n = 9; Atr. 10^{-7} M), 1.33 ± 0.16 nmol ACh/g x min (n = 6; Atr. 10^{-6} M), 1.6 ± 0.51 nmol ACh/g x min (n = 5; Atr. 3×10^{-6} M) und 1.78 ± 0.33 nmol ACh/g x min (n = 7 ; Atr. 3×10^{-6} M + OT 10^{-4} M).

D. DISKUSSION

An dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms wurde mit Hilfe einer von Kilbinger (1973) beschriebenen gaschromatographischen ACh-Bestimmungsmethode der Nachweis einer ACh-Freisetzung durch die nicotinartig wirkende Substanz DMPP geführt. An diesem Präparat konnten Paton u. Zar (1965; 1968) zeigen, daß das ACh aus dem an der Innenseite des Längsmuskelstreifens haftenden Plexus myentericus (Auerbach) freigesetzt wird. Gleichzeitig wiesen sie nach, daß die Längsmuskulatur diesen Transmitter weder enthält noch freisetzt. Perry u. Talesnik (1953) fanden durch Untersuchungen am parasympathischen Ganglion Ciliare, daß nicotinartige Substanzen in der Lage sind, Ganglienzellen zu depolarisieren; diese Depolarisation bewirkt ein über die postganglionäre Nervenfasern laufendes Aktionspotential mit anschließender Transmitterfreisetzung (ACh) an den Synapsen der Effektororgane. Ähnliche Beobachtungen sind von Paton u. Perry (1953), Pascoe (1956), Eccles (1956) u. Ginsborg u. Guerrero (1964) an sympathischen Ganglien gefunden worden.

Die durch ansteigende DMPP-Dosen bewirkte Depolarisation der Ganglienzellen erzeugt neben einer vermehrten

Stimulation auch gleichzeitig einen Anstieg der blockierenden Effekte (Trendelenburg, 1961). Die Erscheinung, daß bei hoher Konzentration nicotinartiger Substanzen die blockierende gegenüber der stimulierenden Wirkung überwiegt, wurde von van Rossum (1962) als "Autoinhibition" bezeichnet. Trendelenburg (1967) stellte in Anlehnung an die Rezeptortheorie von Paton (1961) die Hypothese einer Kombination von hoher Assoziationsgeschwindigkeit nicotinartiger Substanzen zum Nicotinrezeptor des autonomen Ganglions mit einer niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeit von diesen Rezeptoren auf; dadurch wird die Zahl der noch freien Rezeptoren, deren Besetzung eine ACh-Freisetzung am postganglionären Nervenende bewirkt, laufend eingeschränkt. Durch Untersuchungen am isolierten perfundierten Kaninchenherzen konnte Löffelholz (1970) anhand einer Dosiswirkungskurve die blockierende Wirkung hoher DMPP-Konzentrationen auf die Noradrenalinfreisetzung zeigen.

In den eigenen Versuchen beschrieb die Dosiswirkungskurve einen glockenförmigen Verlauf; sie hatte einen ansteigenden und einen abfallenden Ast (Abb.1). Mit einer DMPP-Konzentration von 3×10^{-5} M wurde eine maximale ACh-Freisetzung erreicht (1.82 ± 0.31 nmol ACh/g x min). Auch Vizi (1973) beschrieb am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms für DMPP-Konzentrationen von $1,6 \times 10^{-6}$ - $6,3 \times 10^{-5}$ M eine ansteigende

ACh-Freisetzung. Bei weiterer Steigerung der DMPP-Dosis war es ihm jedoch aus methodischen Gründen nicht möglich, ACh-Freisetzungen zu messen; wegen der atropinartigen Wirkung von DMPP (Benett u. Whitney, 1966) hätten höhere DMPP-Konzentrationen die biologische Bestimmung gestört.

Durch Steigerung der DMPP-Konzentration auf 10^{-4} M resultierte in den eigenen Untersuchungen ein steiler Abfall der ACh-Freisetzung (0.93 ± 0.25 nmol ACh/g x min). Dieser Befund zeigt, daß mit ansteigender DMPP-Konzentration die Blockierung der ACh-Freisetzung schnell eintritt und damit eine geringere ACh-Menge freigesetzt wird. Mit dieser Autoinhibition ließe sich auch die große Streuung der Werte der ACh-Freisetzung durch DMPP erklären: Während der Inkubation diffundiert das DMPP aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Badflüssigkeit und Biophase zum Nicotinrezeptor. Daher ist nicht sofort die gesamte DMPP-Konzentration des Mediums am Rezeptor vorhanden. Die Nicotinrezeptoren werden aber schon erregt, auch wenn noch nicht die volle DMPP-Konzentration am Rezeptor wirksam ist. Der anschließende Block erlaubt aber keine weitere ACh-Freisetzung mehr, wenn die gesamte DMPP-Konzentration des Mediums am Rezeptor erreicht wird. Daher ist die ACh-Freisetzung je nach Präparat sehr unterschiedlich.

DMPP bewirkt am isolierten perfundierten Kaninchenherzen eine schlagartige Noradrenalinfreisetzung (Löffelholz, 1970). Ein schneller Abfall der ACh Freisetzung durch DMPP wurde auch von Vizi (1973) am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms gefunden. Die Halbwertszeit der in 1-Minutenintervallen bestimmten Freisetzung betrug 2,2 Minuten. Das ACh-Freisetzungsmaximum wurde nach 15 Sekunden erreicht. Vizi konnte zeigen, daß dieser Abnahme der Freisetzung nicht eine Entleerung der Transmitterspeicher zugrunde lag, denn Kaliumionen (47mM) konnten in Gegenwart von DMPP auch dann noch eine deutliche Steigerung der ACh-Freisetzungs bewirken, wenn DMPP nach 5-minütiger Inkubationsdauer die ACh-Freisetzungs nicht mehr erhöhte.

In den eigenen Versuchen fiel der ACh-Gehalt der Inkubationsmedien zwischen der 1. und 2. Minute von 4.76 ± 1.34 auf 2.12 ± 0.27 nmol ACh/g x min ab und lag dann bis zur 5. Minute kontinuierlich bei 2 nmol ACh/g x min (Abb. 2). Es liegen somit zwei Phasen der DMPP-bedingten ACh-Freisetzungs vor: Eine schnelle in der 1. Minute und eine ab der 2. Minute deutlich werdende kontinuierliche ACh-Freisetzungsphase.

Es ist bekannt, daß in Gegenwart von Cholinesterasehemmstoffen ACh im Gewebe außer in Vesikeln auch in einem extravasikulären Pool als sog. "Surplus-ACh" vorliegt

(Hebb, 1972). Es wäre denkbar, daß DMPP eine ACh-Freisetzung aus beiden Pools bewirkt. Einerseits wird mit DMPP durch Stimulation von Nicotinrezeptoren vesikuläres ACh am Nervenende freigesetzt; dieser Mechanismus wird durch die Autoinhibition begrenzt und entspricht der schnellen ACh-Freisetzungsphase. Außerdem könnte DMPP auch gleichzeitig ohne diese Regulation kontinuierlich extravesikuläres ACh freisetzen. Eine ähnliche Vermutung wurde von Koelle (1971) geäußert. Er nahm an, daß Carbachol (welches u.a. nicotinartige Wirkungen hat) am oberen Halsganglion der Katze eine ACh-Freisetzung aus Vesikeln und aus den extravesikulären Speichern verursacht.

Hexamethonium verminderte die Ruhefreisetzung von 0.71 ± 0.09 nmol ACh/g x min auf 49 % des Ausgangswertes (Abb. 3). Nach Paton und Zar (1968) hemmt Hexamethonium denjenigen Anteil der Ruhefreisetzung, der durch Erregung von intramuralen Ganglienzellen und durch anschließende fortgeleitete Aktionspotentiale in den cholinergen Nerven zustande kommt.

Die ACh-Freisetzung durch DMPP (nach Abzug der Ruhefreisetzung) sank nach Hexamethoniumzusatz von 1.34 ± 0.55 um durchschnittlich 90 % auf 0.12 ± 0.05 nmol ACh/g x min. Die Summe der durch Hexamethonium reduzierten Ruhe- und DMPP-abhängigen Freisetzung betrug

0.46 ± 0.27 nmol ACh/g x min und damit nur 65 % der Ruhefreisetzung in Gegenwart von DFP-Tyrode. Die vollständige Hemmung der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung durch Hexamethonium zeigt, daß DMPP durch eine Stimulierung von Nicotinrezeptoren die ACh-Freisetzung verursacht. In der Literatur werden für nicotinartige Substanzen und für Hexamethonium unterschiedliche Angriffspunkte an vegetativen Ganglien in Erwägung gezogen:

1. Chiou (1973) meint, daß Hexamethonium an den präganglionären Nervenenden die Aufnahme von DMPP in die terminale Nervenfasern blockiert. Folglich wird eine Verdrängung des ACh durch nicotinartige Substanzen in den synaptischen Raum mit nachfolgender Depolarisation der postsynaptischen Membran verhindert. Mit Hilfe von ^3H -markiertem Nicotin wiesen Brown et al. (1971) am Halsganglion der Ratte die transmembranöse Aufnahme dieser Substanz nach.

2. Auf der anderen Seite werden als Wirkort von Hexamethonium ganglionäre Nicotinrezeptoren diskutiert (Iorio u. Mc Isaac, 1966; Trendelenburg, 1967); Hexamethonium könnte daher den Angriff von DMPP an diesen Rezeptoren und folglich die Depolarisation verhindern.

Die Nicotinrezeptoren liegen nach Vizi (1973) an der ganglionären Membran. Er fand bei Untersuchungen am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms, daß die ACh-Freisetzung durch DMPP in Gegenwart von Tetro-

dotoxin gehemmt war. Ähnliche Beobachtungen sind auch von Gershon (1967) und Chiou (1973) beschrieben worden. Beide Autoren fanden, daß die darmkontrahierende Wirkung von DMPP durch Tetrodotoxin gehemmt wurde. Vizi vermutete daher, daß DMPP nicht in der Lage zu sein scheint, an den terminalen postganglionären parasymphathischen Nervenfasern ACh freizusetzen. Andererseits kann aber mit Tetrodotoxin nicht die durch hohe Kaliumkonzentrationen hervorgerufene ACh-Freisetzung gehemmt werden (Paton et al., 1971).

Es liegt somit nahe, als Wirkort des DMPP, an der ganglionären Membran gelegene Nicotinrezeptoren anzunehmen; deren Besetzung führt zu einer Depolarisation dieser Membran und nachfolgendem Aktionspotential in der postganglionären Nervenfasern. Hexamethonium würde somit die Rezeptorbesetzung durch DMPP, Tetrodotoxin die Fortleitung des Aktionspotentials hemmen.

Im Gegensatz dazu liegen im sympathischen Nervensystem die Nicotinrezeptoren, die die Noradrenalinfreisetzung vermitteln, an terminalen postganglionären Fasern des Sympathikus (Löffelholz, 1970; Muscholl, 1970).

Die Calciumabhängigkeit der ACh-Freisetzung aus autonomen Ganglien wurde von Harvey u. McIntosh (1940) beschrieben. Katz u. Miledi (1967) zeigten, daß Calciumionen in das Nervenende eindringen; ohne ein gleichzeitig über die Nervenfaser laufendes Aktionspotential ist Calcium jedoch nicht in der Lage, den Transmitter in dem synaptischen Raum freizusetzen (Katz, 1969). Damit stellen die Calcium-Ionen eine Beziehung zwischen präsynaptischer Depolarisation und Transmitterfreisetzung her.

Andererseits zeigten Paton et al. (1971), daß gleichzeitiger Natrium- und Calciumionenentzug aus der Tyrode die ACh-Abgabe aus cholinergen Nervenendigungen erhöht. In Anwesenheit eines Membran-ATP-ase Inhibitors wies Vizi (1972) an Rattenhirnschnitten auch ohne Calciumionen eine ACh-Freisetzung nach. Vizi (1972) stellte die Vermutung auf, daß der ACh-Freisetzungsmechanismus unter anderem unabhängig von der Anwesenheit der Calciumionen in der Inkubationsflüssigkeit sei und schrieb der ACh-Freisetzungssteigerung eine Hemmung der durch Natrium-, Kalium- und Magnesiumionen zu aktivierenden Membran-ATP-ase in den Nervenendigungen zu. Am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms beschrieb Vizi (1972) eine partielle Calciumionenabhängigkeit der ACh-Ruhefreisetzung. Nach elektischer Feldstimulation zeigte Vizi (1972) eine Hemmung der

Freisetzung von 2.95 auf 0.08 nmol ACh/g x min.

In den eigenen Versuchen fand sich nach Inkubation der Präparate in calciumarmer Tyrode (Ca^{++} 0.36 mVal) eine Hemmung der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung auf 3 %. Die Ruhefreisetzung wurde durch Inkubation in calciumarmer Tyrode nicht beeinflusst (Abb. 4).

An Hirnschnitten der Ratte bewirkt Oxotremorin eine Hemmung der ACh-Freisetzung (Szerbu, Somogyi, 1973). Die Autoren erklärten diese Verminderung mit einem negativen Feedback-Mechanismus: das muskarinartig wirkende Oxotremorin ist durch Besetzung von Muskarinrezeptoren in der Lage, die Freisetzung des ACh zu hemmen. Kilbinger u. Wagner (1975) konnten diese Ergebnisse am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchen-dünndarms bestätigen. Da Oxotremorin die Ruhefreisetzung hemmte, in Anwesenheit von Atropin jedoch dieser Effekt aufgehoben war, postulierten sie als gemeinsamen Wirkort dieser beiden Substanzen inhibitorische Muskarinrezeptoren. Sie zeigten auch, daß die Oxotremorinwirkung nicht die eventuell verminderte Syntheseleistung, sondern nur die Freisetzung von ACh beeinflusste. Man könnte daher folgern, daß das muskarinartig wirkende ACh durch Besetzung von Muskarinrezeptoren im Sinne eines Feedback-Mechanismus seine

eigene Freisetzung beeinflussen kann (Szerbu. Somogyi, 1973; Kilbinger u. Wagner, 1975).

In den eigenen Versuchen hemmte Oxotremorin die durch DMPP hervorgerufene ACh-Freisetzung. Oxotremorin 10^{-5} M und 10^{-4} M senkten sie signifikant auf 71 ± 6 % ($p < 0.05$) bzw. 52 ± 7 % ($p < 0.005$) gegenüber dem Kontrollfreisetzungsverhältnis von $99,8 \pm 7$ % (Abb. 5).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die zuvor mit Oxotremorin behandelten Organpräparate nochmals in eine DMPP-haltige Tyrodelösung inkubiert (D_3 : 60 - 63 min). Es wurde damit überprüft, ob die Längsmuskelstreifen nach vorangegangener Oxotremorininkubation auf DMPP-Stimulation noch ansprechbar waren. Es resultierte bei den zuvor mit Oxotremorin 10^{-5} M bzw. 10^{-4} M behandelten Präparaten nur eine leichte Steigerung der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung auf 77 ± 8 % bzw. 79 ± 6 %. Die entsprechende DMPP-Kontrolle (ohne vorherige Oxotremorinbehandlung) lag mit 104 ± 14 % im Größenordnungsbereich der Kontrollfreisetzung ($99,8 \pm 7$ %).

Die ACh-Freisetzungen der 3. Inkubationsperiode waren jedoch im t-Test nicht signifikant von den ACh-Freisetzungen des 2. Inkubationsintervalles unterschieden. Man könnte dies mit einer schlechten Auswaschbarkeit von Oxotremorin aus dem Organpräparat erklären.

Ein Feedback-Mechanismus für die Noradrenalinfreisetzung wurde am sympathischen Nervensystem schon eingehend erforscht (Langer, 1974). Starke (1972) wies am perfundierten Kaninchenherzen nach elektrischer Stimulation des postganglionären Sympathikus eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung durch die α -Rezeptoragonisten Oxymetazolin und Phenylephrin nach. Hingegen erhöhen die α -Rezeptorenblocker Phenoxybenzamin und Phentolamin die Noradrenalinfreisetzung (Farnebo u. Hamberger, 1971; Starke, 1972; Enero et al., 1972).

Am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms beschrieben Paton u. Vizi (1969) eine Hemmung der elektrisch stimulierten ACh-Freisetzung mit exogen zugeführtem Noradrenalin, Adrenalin und Phenylephrin. Sie zogen daher eine sympathische Steuerung der ACh-Freisetzung durch präsynaptisch lokalisierte α -Rezeptoren in Betracht.

In in-vivo-Experimenten am Hirn der narkotisierten Katze konnte Atropin die durch elektrische Reize hervorgerufene ACh-Freisetzung erhöhen (Dudar u. Szerb, 1969). Die durch eine hohe K^+ -Konzentration evozierte ACh-Freisetzung an Rattenhirnschnitten wurde ebenfalls mit Atropin gesteigert (Molenaar u. Polak, 1970).

Diese Befunde konnten nun auch an einem peripheren

Organpräparat bestätigt werden. Die benutzten Atropinkonzentrationen erhöhten die DMPP-bedingte ACh-Freisetzung auf $124 \pm 11 \%$ (Atr. 10^{-7} M), $228 \pm 20 \%$ (Atr. 10^{-6} M) und $220 \pm 48 \%$ (Atr. 3×10^{-6} M) gegenüber der Kontrolle von $99,8 \pm 7 \%$ (Abb. 6). Diese Ergebnisse könnte man wieder mit dem oben erwähnten Feedback-Mechanismus erklären: Atropin kann kompetitiv für freigesetztes ACh die Muskarinrezeptoren besetzen. Da ACh seine eigene Freisetzung durch negative Rückkopplung (d.h. Eigenhemmung infolge Besetzung von Muskarinrezeptoren) hemmen kann und dieser Regelkreis mit Atropin unterbrochen wird, resultiert eine gegenüber dem Normalzustand gesteigerte Freisetzung. Diese Steigerung der Freisetzung ist reversibel; setzte man der DMPP-haltigen Tyrodelösung mit Atropin (3×10^{-6} M) gleichzeitig das muskarinartig wirkende Oxotremorin (10^{-4} M) hinzu, so sank die vorher durch Atropin erhöhte ACh-Freisetzung auf $92 \pm 10 \%$ und damit wieder auf das Kontrollfreisetzungsniveau von $99,8 \pm 7 \%$ ab.

Am untersuchten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms scheinen somit zwei Regulationsprinzipien der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung wirksam zu werden:

1. An den ganglionären Synapsen erzeugt DMPP durch Stimulation von Nicotinrezeptoren eine ganglionäre Depolarisation mit einem über die postganglionäre Nervenfaser laufenden Aktionspotential und einer Frei-

setzung von ACh aus den postganglionären terminalen Nervenfasern. Diese Freisetzung von ACh unterliegt einer Autoinhibition.

2. Das freigesetzte ACh steuert über einen negativen Feedback-Mechanismus durch Wirkung an den Muskarinrezeptoren seine eigene Freisetzung.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Im isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchen-dünndarms wurden einige Bedingungen der durch DMPP hervorgerufenen ACh-Freisetzung untersucht. Nach einer Vorinkubation von 90 Minuten in DFP-Tyrode (10^{-5} M) wurden die Organpräparate mit DMPP-haltiger Tyrode allein und anschließend mit den untersuchten Pharmaka zusammen inkubiert. Das aus dem Plexus myentericus (Auerbach) freigesetzte ACh wurde gaschromatographisch bestimmt.

Die Dosiswirkungskurve für die Freisetzung von ACh durch DMPP-Konzentrationen von 10^{-6} - 10^{-4} M beschrieb einen glockenförmigen Verlauf. Das Maximum der ACh-Freisetzung wurde mit einer 3×10^{-5} M DMPP-Konzentration erreicht (1.82 ± 0.31 nmol ACh/g x min). Der anschließend auftretende steile Abfall der Dosiswirkungskurve wurde mit einer Autoinhibition der ACh-Freisetzung erklärt.

Der Zeitverlauf der in 1-Minutenabständen untersuchten ACh-Freisetzung durch DMPP beschrieb zwei Phasen: Eine schnelle ACh-Freisetzung in der ersten Minute und eine anschließende kontinuierliche ACh-Freisetzung, von der 2. - 5. Minute.

Unter Verwendung von Hexamethonium (2.8×10^{-4} M) zeigte sich eine Hemmung der DMPP-bedingten ACh-Freisetzung auf 10 ± 4 %. Die Ruhéfreisetzung wurde auf 49 % verringert.

In Gegenwart einer calciumarmen Tyrode (Ca^{++} 0.36 mVal) wurde die durch DMPP stimulierte ACh-Freisetzung fast vollständig gehemmt.

Oxotremorin konnte die DMPP-abhängige ACh-Freisetzung signifikant vermindern. Dabei wurden die in Gegenwart von Oxotremorin 10^{-5} bzw. 10^{-4} M erhaltenen ACh-Mengen (D_2) in Prozent der ACh-Freisetzung ohne diese Substanz (D_1) ausgedrückt. Für die Oxotremorinkonzentrationen 10^{-5} bzw. 10^{-4} M betrug die ACh-Freisetzungshemmung 71 ± 6 % bzw. 52 ± 7 % gegenüber den Kontrollfreisetzungen (99.8 ± 7 %). Es wird vermutet, daß diese Substanz durch Besetzen von Muskarinrezeptoren die ACh-Freisetzung im Sinne eines lokalen negativen Feedback-Mechanismus hemmt.

Atropin (10^{-6} M) erhöhte die DMPP-bedingte ACh-Freisetzung signifikant auf 228 ± 20 % gegenüber den Kontrollfreisetzungen (99.8 ± 7 %). Diese Steigerung der Freisetzung wird mit einer Unterbrechung des negativen Feedback-Mechanismus erklärt. In Gegenwart von Oxotremorin (10^{-4} M) plus Atropin (3×10^{-6} M) war die ACh-Freisetzung durch DMPP gegenüber der Kontrollfreisetzung unverändert.

Es werden zwei Regulationsmechanismen der durch DMPP evozierten ACh-Freisetzung diskutiert: eine an den Nicotinrezeptoren wirkende Autoinhibition der ACh-Freisetzung, sowie eine Eigenhemmung des endogen freigesetzten ACh durch Besetzung von Muskarinrezeptoren.

F. LITERATURVERZEICHNIS

AMBACHE, N.

Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as a broad sheet.

J. Physiol. 125, 53 - 54 (1954)

BENNET, A.; B.WHITNEY

A pharmacological investigation of human isolated stomach.

Br. J. Pharmacol. 27, 286 - 297 (1966)

BIRMINGHAM, A.T.; A.B. WILSON

An analysis of the blocking action of dimethyl-phenyl-piperazinium iodide on the inhibition of isolated small intestine produced by stimulation of the sympathetic nerves.

Br. J. Pharmacol. 24, 375 - 386 (1965)

BROWN, J.B.; V.HALLIWALL; C.N. SCHOLFIELD

Uptake of nicotine and extracellular space markers by isolated rat ganglia in relation to receptor activation.

Br. J. Pharmacol. 42, 100 - 113 (1971)

CHEN, G.; R. PORTMAN; A. WICKEL

Pharmacology of 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide, a ganglion-stimulating agent.

J. Pharmacol. exp. Ther. 103, 330 - 336 (1951)

CHIOU, C.Y.

Mechanism of acetylcholine release by drugs and its blockade.

Arch. int. Pharmacodyn. 201, 170 - 181 (1973)

COX, B.; S.E. HECKER

Investigation of the mechanism of action of oxotremorin on the guinea-pig isolated ileum preparation.

Br. J. Pharmacol. 41, 19 - 25 (1971)

DAY, M. ;J.R. VANE

An analysis of the direct and indirect actions of drugs on the isolated guinea-pig ileum.

Br. J. Pharmac. Chemother. 20, 150 - 170 (1963)

DRYDEN, W.F.; A.L. HARVEY; J.G. MARSHALL

Pharmacological studies on the bungarotoxins:
An analysis of the site of action of nicotinic agonists.
Europ. J. Pharmacol. 26, 262 - 267 (1974)

DUDAR, J.D.; J.C. SZERB

The effect of topically applied atropine on resting and
evoked cortical acetylcholine release.
J. Physiol. 203, 741 - 762 (1969)

ECCLES, R.M.

The effect of nicotine on synaptic transmission in the
sympathetic ganglion.
J. Pharmacol. exp. Ther. 118, 26 - 38 (1956)

ENERO, M.A. S.Z. LANGER; R.P. ROTHLIN

Role of the α -adrenoceptor in regulating noradrenaline
overflow by nerve stimulation.
Br. J. Pharmacol. 44, 672 - 688 (1972)

FARNEBO, L.O.; B. HAMBERGER

Drug induced changes in the release of [^3H] -noradrenaline
from field stimulated rat iris.
Br. J. Pharmacol. 43, 97 - 106 (1971)

GERSHON, M.D.

Effects of tetrodotoxin on innervated smooth muscle
preparation.
Br. J. Pharmacol. 29, 259 - 279 (1967)

GINSBORG, B.L.; S. GUERRERO

On the action of depolarizing drugs on sympathetic
ganglion cells of the frog.
J. Physiol. 172, 189 - 206 (1964)

HARVEY, A.M.; F.C. Mc INTOSH

Calcium and synaptic transmission in a sympathetic
ganglion.
J. Physiol. 97, 408 - 416 (1940)

HEBB, C.

Biosynthesis of acetylcholine in nervous tissue.
Physiol. Rev. 52, 918 - 957 (1972)

IORIO, L.C.; R.J. Mc ISAAC

Comparison of the stimulating effects of nicotine, pilocarpine and histamine on the superior cervical ganglion of the cat.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 151, 430 - 437 (1966)

KATZ, B.

The release of neural transmitter substances.

The Sherrington Lectures no X., Liverpool, 1969.

KATZ, B.; R. MILEDI

Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer.

J. Physiol. 203, 689 - 706 (1969)

KILBINGER, H.

Gas chromatographic estimation of acetylcholine in the rabbit heart using a nitrogen selective detector.

J. Neurochem. 21, 421 - 429 (1973)

KILBINGER, H.; P. WAGNER

Inhibition by oxotremorine of acetylcholine resting release from guinea-pig ileum longitudinal muscle strips. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., im Druck (1975)

KOELLE, G.B.

Current concepts of synaptic structure and function.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 183, 5 - 20 (1971)

KOLLER, S.

Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. 4. Auflage, Darmstadt, 1969.

LANGER, S.Z.

Presynaptic regulation of catecholamine release.

Biochem. Pharmacol. 23, 1793 - 1800 (1974)

LINDMAR, R.

Die Wirkung von 1,1-Dimethyl-4-Phenyl-Piperazinium-Jodid am isolierten Vorhof im Vergleich zur Tyramin- und Nicotinwirkung.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.Path.Pharmak. 242, 458-466 (1962)

LÖFFELHOLZ, K.

Autoinhibition of nicotinic release of noradrenaline from postganglionic sympathetic nerves.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 267, 49 - 63 (1970)

MOLENAAR, P.C.; R.L. POLAK

Stimulating by atropine of acetylcholine release and synthesis in cortical slices from rat brain.

Br. J. Pharmacol. 40, 406 - 417 (1970)

MUSCHOLL, E.

Cholinomimetic drugs and release of the adrenergic transmitter.

Bayer-Symposium II, Heidelberg, N.Y. 1970, S. 168 - 186.

PASCOE, J.E.

The effects of acetylcholine and other drugs on the isolated superior cervical ganglion.

J. Physiol. 132, 242 - 255 (1956)

PATON, W.D.M.

A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination.

Proc. roy. Soc. B. 154, 21 - 69 (1961)

PATON, W.D.M.; W.L.M. PERRY

The relationship between depolarisation and block in the cat's superior cervical ganglion.

J. Physiol. 119, 43 - 57 (1953)

PATON, W.D.M.; E.S. VIZI

The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip.

Br. J. Pharmacol. 35, 10 - 28 (1969)

PATON, W.D.M.; E.S. VIZI; A.M. ZAR

The mechanism of acetylcholine release from parasympathetic nerves.

J. Physiol. 215, 819 - 848 (1971)

PATON, W.D.M.; A.M. ZAR

A denervated preparation of the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum.

J. Physiol. 179, 85 - 86 (1965)

PATON, W.D.M.; M.A. ZAR

The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strip.

J. Physiol. 194, 13 - 33 (1968)

PERRY, W.L.M.; J. TALESNIK

The role of acetylcholine in synaptic transmission at parasympathetic ganglia.

J. Physiol. 119, 455 - 469 (1953)

RANG, H.P.

Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle.

Br. J. Pharmacol. 22, 356 - 365 (1964)

ROSSUM, J.M. van

Classification and molecular pharmacology of ganglionic blocking agents. Part I. Mechanism of ganglionic synaptic transmission and mode of action of ganglionic stimulants.

Int. J. Neuropharmacol. 1, 97 - 110 (1962)

STANGE, K.

Angewandte Statistik. 1. Teil. Eindimensionale Probleme.

Heidelberg. N.Y., 1970. S. 223 - 234

STARKE, K.

Alpha sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart.

Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 271, 18 - 45 (1972)

SZERB, J.C.; G.T. SOMOGY

Depression of acetylcholine release from cerebral cortical slices by cholinesterase inhibition and by oxotremorine.

Nature 241, 121 - 122 (1973)

TRENDELENBURG, U.

Observations on the mode of action of some non-depolarizing ganglion-blocking substances.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 241,
452 - 466 (1961)

TRENDELENBURG, U.

Some aspects of the pharmacology of autonomic ganglion cells.
Reviews of Physiology, Biochemistry and Experimental
Pharmacology. Ed. by R. Jung et al., Berlin 1967; S. 1 - 85

VIZI, E.S.

Stimulation by inhibition of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++})$ -activated
ATP-ase of acetylcholine release in cortical slices
from rat brain.

J. Physiol. 226, 95 - 117 (1972)

VIZI, E.S.

Acetylcholine release from guinea-pig ileum by parasympathetic ganglion stimulants and gastrin-like polypeptides.
Br. J. Pharmacol. 47, 765 - 777 (1973)

WINBURY, M.M.

Comparison of the vascular actions of 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium and tetramethylammonium.

J. Pharmacol. exp. Ther. 124, 25 - 34 (1958)

Lebenslauf

Am 9. März 1950 wurde ich als erstes Kind des Ingenieurs Karl-Heinz Dzieniszewski und seiner Ehefrau Gertraude, geb. Krebs, in Koblenz geboren. Meine Schulausbildung begann ich 1956 in der evangelischen Comeniusschule in Koblenz, von der ich 1960 auf das Staatliche Eichendorff-Gymnasium in Koblenz überwechselte. Dort legte ich 1968 die Reifeprüfung ab. Danach wurde ich zu einem verkürzten 12-monatigen Grundwehrdienst eingezogen. Zum Wintersemester 1969/70 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, bestand dort nach zwei Semestern das Vorphysikum und nach weiteren drei Semestern im März 1972 das Physikum. Das medizinische Staatsexamen werde ich voraussichtlich bis zum Juli 1975 in Mainz beenden.

